

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**



<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : G01R 33/48, A61B 5/055</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 98/39664</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 11 de Septiembre de 1998 (11.09.98)</p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES98/00045</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 26 de Febrero de 1998 (26.02.98)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: P 9700496 6 de Marzo de 1997 (06.03.97) ES</p> <p>(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACION A DISTANCIA [ES/ES]; Calle Bravo Murillo, 38-4ª Pta., E-28015 Madrid (ES). CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]; Calle Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). THE UNIVERSITY OF ARIZONA [US/US]; 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US). THE JOHNS HOPKINS SCHOOL OF MEDICINE [US/US]; 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US).</p> <p>(72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): BALLESTEROS GARCIA, Paloma [ES/ES]; Universidad Nacional de Educación a Distancia, Calle Bravo Murillo, 38-4ª Pta., E-28015 Madrid (ES). GIL CONZALEZ, Mª Soledad [ES/ES]; Universidad Nacional de Educación a Distancia, Calle Bravo Murillo, 38-4ª Pta., E-28015 Madrid (ES). ZADERENKO PAR-</p>		
<p style="text-align: right;">TIDA, Paula [ES/ES]; Universidad Nacional de Educación a Distancia, Calle Bravo Murillo, 38-4ª Pta., E-28015 Madrid (ES). Cerdan Garcia-Esteller, Sebastián [ES/ES]; Insto. Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES). ALVAREZ PEREZ, Jose [ES/ES]; Insto. Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES). GILLIES, Robert, J. [US/US]; The University of Arizona, 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US). NATARAJAN, Raghunand [US/US]; The University of Arizona, 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US). VAN SLUIS, Robert [US/US]; The University of Arizona, 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US). BHUJWALA, Zaver [US/US]; The Johns Hopkins School of Medicine, 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US).</p> <p>(74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro; Calle Serrano, 113, E-28006 Madrid (ES).</p> <p>(81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p style="text-align: right;">Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i></p>		
<p>(54) Title: PROCESS FOR OBTAINING IMAGES AND SPECTRA OF THE EXTRACELLULAR pH BY MAGNETIC RESONANCE WITH EXTRINSIC INDICATORS CONTAINING ¹H OR ¹⁹F</p> <p>(54) Título: PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCION DE IMAGENES Y ESPECTROS DEL pH EXTRACELULAR POR RESONANCIA MAGNETICA CON INDICADORES EXTRINSECOS CONTENIENDO ¹H O ¹⁹F</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The process comprises obtaining an image or spectrum MR having any characteristic or MR sensitive to the pH of molecules impervious to the membrane. Normally, the chemical displacement of a nucleus located in or at the vicinity of a ionisable group of a non permeating molecule is used as "pH informing resonance" in the extracellular space. Various MR methods (chemical displacement selective image (CSIC) or spectroscopic image (SL)) enable to determine the distribution in the space of the "informational resonance" and therefore the distribution of the extracellular pH in the sample. Said information is useful for example in clinical situations such as muscular dystrophies, ischemia, tumoral transformation and metastases.</p> <p>(57) Resumen</p> <p>El abordaje consiste en la obtención de una imagen o espectro MR de cualquier propiedad de MR sensible al pH de moléculas impermeables a la membrana. Normalmente se utiliza el desplazamiento químico de un núcleo localizado en, o en la proximidad de, un grupo ionizable de una molécula no permeante como "resonancia informadora del pH" en el espacio extracelular. Varios métodos de MR (CSIC-imagen selectiva del desplazamiento químico o SL-imagen espectroscópica) permiten la determinación de la distribución en el espacio de la "resonancia informadora", y por tanto la distribución del pH extracelular en la muestra. Esta información resulta útil, entre otras, en situaciones clínicas como las distrofias musculares, la isquemia, la transformación tumoral y las metástasis.</p>		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelanda	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

TÍTULO

PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE IMAGENES Y ESPECTROS DEL pH EXTRACELULAR POR RESONANCIA MAGNÉTICA CON INDICADORES EXTRÍNSECOS CONTENIENDO ^1H Ó ^{19}F .

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

- Medicina Física.
- Sector Farmacéutico.
- Investigación Biomédica.
- 10 • Diagnóstico por imagen.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las aplicaciones biomédicas de la Resonancia Magnética (MR) han experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas (Andrew, E.R.,
15 Bydder, G., Griffiths, J., Iles, R. y Styles, P. Eds. (1990) *Clinical Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy*. John Wiley and Sons. New York). Se han utilizado tanto la Espectroscopia (MRS) como la Imagen (MRI) por Resonancia Magnética para estudiar no invasivamente procesos fisiológicos y patológicos en animales y seres humanos (Gillies, R.J. Ed. (1994) *NMR in*
20 *Physiology and Biomedicine*, Academic Press, New York). También ha sido posible extender las aplicaciones de la MR a estudios sobre la fisiología y patología al nivel celular (Gillies, R.J., Gallons, J.P., McGovern, K.A., Scherrer, P.G., Lien, Y.H., Job, C., R., Chapa, F., Cerdán, S. y Dale, B.E. (1993) *NMR in Biomedicine* 6,95-104). Tomados en su conjunto, estos avances han hecho
25 posible estudiar por MR, de una manera integrada, algunos aspectos fundamentales de la Biología y la Medicina, incluyendo la proliferación y diferenciación celular y la transformación tumoral. Estos procesos ocurren con cambios concomitantes en el pH intra y extracelular. Adicionalmente, el pH es una variable fisiológica crucial en otros procesos fundamentales como el
30 ejercicio y la fatiga muscular, el control metabólico y la transducción del mensaje.

hormonal (Roos, A. y Boron, W.F. (1981) *Physiol. Rev* 61,296-696).

La concentración de protones intracelulares es el resultado del balance entre los procesos de producción y consumo intracelular de protones, la captación o extrusión de protones al medio extracelular y la capacidad de tamponamiento intracelular (Moldes, M., Cruz, F., Chapa, F. y Cerdán, F. y Cerdán S. (1995) *Quart. Mag. Res. in Biol. Med.* 2,5-17). Dado que esta última es normalmente constante, un aumento en la producción de protones intracelulares se puede compensar por la extrusión de ácido ó captación de base del medio extracelular y un aumento en la producción intracelular de base se podría compensar por el mecanismo opuesto. Por tanto, cambios en el pH extracelular reflejan normalmente modificaciones en el pH intracelular y las medidas del pH extracelular proporcionan una herramienta muy útil para monitorizar alteraciones en la homeostasis del pH intracelular.

Los métodos disponibles actualmente para la determinación del pH en muestras biológicas incluyen métodos potenciométricos (electrodos de pH), técnicas radiométricas, métodos ópticos y abordajes de Resonancia Magnética (Henderson, R.M. y Graf, J (1988) In pH Homeostasis: Mechanisms and Control (Häussinger, D. Ed.) Academic Press, pg 5-26). La utilización de una sonda molecular impermeable a la membrana, ya sea radioactiva, cromófora, fluorescente, fosforescente ó activa en MR permite a cualquiera de estos métodos medir exclusivamente el pH extracelular. Sin embargo, entre la variedad de los métodos disponibles, tan sólo la MR permite la obtención de imágenes no invasivas de la totalidad del volumen tridimensional de muestras ópticamente opacas. Estas características hacen de la MR el método de elección para la determinación no invasiva del pH extracelular en especímenes biológicos. En esta patente describimos el uso y aplicaciones de una nueva serie de moléculas indicadoras que permiten la determinación del pH intracelular y el pH extracelular por métodos de MRS y MRI.

Los abordajes previos han utilizado principalmente ^{31}P MRS y el desplazamiento químico del fosfato inorgánico para la medida del pH intracelular en

suspensiones celulares, órganos perfundidos, tejidos, animales intactos o incluso seres humanos (Moon, R.B. y Richards, J.H. (1973) *J. Biol. Chem* 248, 7276-7278). Una variante de este método ha permitido medir exclusivamente el pH extracelular por 1D- ^{31}P MRS en suspensiones de células utilizando fosfonatos impermeables a la membrana plasmática (Gillies, R.J., Liu, Z. Y Bhujwalla, Z. (1994) *Am.J.Physiol.* 267, C195-C203). Por otro lado, se han propuesto técnicas de ^{31}P MRS localizada que permiten obtener espectros de ^{31}P RMN de una región espacial especificada (voxel) dentro de un animal intacto, y así determinar por el desplazamiento químico del P_i , el pH intracelular promedio en la región seleccionada (Aue, W.P. (1986) *Rev. Mag. Res. Med.* 1:21-72; Ordidge, R.J., Connelly, A. y Lohman, J.A.B. (1986) *J. Mag. Res.* 66:283-294; Frahm, J., Bruhn, H., Gyngell, M.N.L., Merboldt, K.D., Hanike, W. Y Sauter, R (1989) *Mag. Res. Med.* 9:79-93). También se han desarrollado metodologías de imagen multivoxel por ^{31}P MRS. Estas técnicas permiten obtener simultáneamente, espectros de ^{31}P RMN de una colección de voxels adyacentes que cubren completamente el volumen tridimensional del espécimen, proporcionando así, mapas tridimensionales de la distribución del pH a través de la muestra (Brown, T.R., Kincaid, B.M. y Ugurbil, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:3523-3526; Maudsley, A.A., Hilal, S.K., Perman, W.H. y Simon, H.E. (1983). *J. Mag. Res.* 66:283-294; Vigneron, D.B., Nelson, S.J., Nat, R, Murphy-Boesch, J., Kelley, D.A.C., Kessler, H.B., Brown, T.R. y Taylor, J.S. (1990) *Radiology* 177:643-649; Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1994) *Mag. Res. in Med.* 32, 277-84; Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1993) *Mag. Res. in Med.* 30, 661-71).

A pesar de estos progresos, la aplicación de los métodos de ^{31}P MRS para la determinación del pH ha estado tradicionalmente limitada por la baja sensibilidad del núcleo de ^{31}P . Así, los métodos de ^{31}P MRS requieren tiempos de adquisición largos y tamaños de voxel grandes para obtener una adecuada relación señal/ruido. Estas dos circunstancias reducen significativamente la resolución temporal y espacial de la medida de pH por ^{31}P MRS. Ambas

limitaciones se pueden aliviar mediante el uso de ^1H ó ^{19}F , dos núcleos inherentemente más sensibles en MR que ^{31}P (Gadian, D.G. (1982) *Nuclear Magnetic Resonance and its applications to living systems*. Oxford University Press. pg 8). Este aumento de sensibilidad de ^1H (^{19}F) MRS frente a ^{31}P MRS permitiría obtener espectros o imágenes 1-D, 2-D ó 3-D, similares a los de ^{31}P en señal/ruido, pero 4(3), 16(12), ó 64(43) veces más rápido que con ^{31}P MRS. También se podría obtener, utilizando ^1H (^{19}F) MRS una reducción significativa del tamaño de voxel empleado en adquisiciones con ^{31}P MRS, manteniendo las mismas condiciones de señal/ruido. Sin embargo, la presencia de metabolitos intrínsecos conteniendo resonancias de ^1H apropiadas es excepcional (Yoshizaki, K., Seo, Y. y Nishikawa, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* 678, 283-291) y no existen naturalmente metabolitos conteniendo ^{19}F . Estas circunstancias hacen indispensable el uso de sondas extrínsecas conteniendo núcleos de ^1H (Rabenstein, D.L. e Isab, A. (1982) *Anal. Biochem.* 121, 423) ó ^{19}F (Deutsch, C., Taylor, J.S. y Wilson, D.F. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, 79, 7944) sensibles al pH para poder implementar con éxito las técnicas de ^1H ó ^{19}F MRS ó MRI en la medida del pH intracelular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

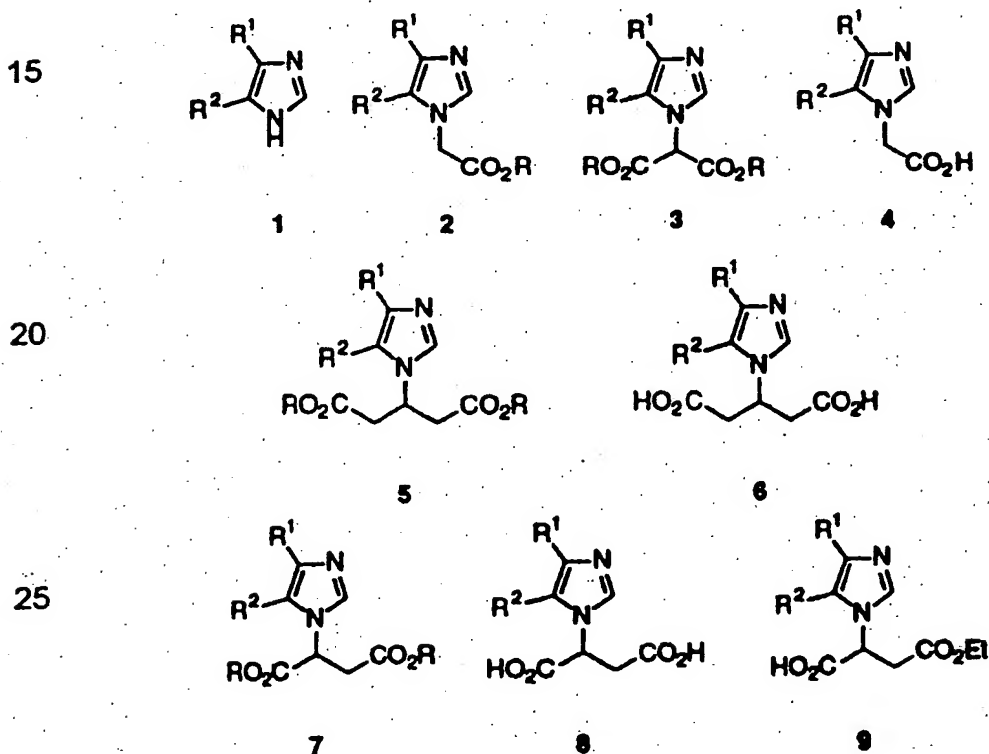
Algunos de nosotros hemos descrito recientemente la síntesis de una nueva serie de indicadores para la medida del pH intracelular, pH extracelular y volumen celular por ^1H RMN en suspensiones celulares (Gil, M.S., Cruz, F., Cerdan, S. y Ballesteros, P. (1992) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2, 1117-1722 ; Gil, M.S., Zaderenko, P., Cruz, F., Cerdan, S. y Ballesteros, P. (1994) *Bioorg. Med. Chem.* 2, 305- 14 ; Zaderenko, P., Gil, M.S., Ballesteros, P. y Cerdan, S. (1994) *J. Org. Chem.* (1994) 59,6268-73). En esta patente, se describen algunas propiedades farmacológicas y toxicológicas de estas moléculas útiles para su empleo como indicadores de pH en cultivos celulares y animales enteros y se demuestran los procedimientos de obtención de imágenes del pH tanto *in vitro* en sistemas modelo como *in vivo* en ratones portadores de tumores RIF-1. La

5

utilización de estos nuevos indicadores en conjunción con tecnologías de ^1H MR como la imagen de desplazamiento químico (CSI) o la imagen espectroscópica (SI) permiten una disminución considerable en los tiempos de adquisición y un aumento significativo en la resolución de las medidas de pH en comparación con los métodos previos basados en la utilización de ^{31}P MR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

El esquema 1 muestra las estructuras de algunas moléculas indicadoras útiles en medidas del pH por ^1H MRS. Los compuestos más relevantes como sondas permeables para la medida simultánea del pH intra- y extracelular son; el imidazol (1, $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$) y el ácido imidazol-1-ilacético (4, $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$), y como sonda no permeable para medidas del pH extracelular; el ácido (\pm)-3-(etoxicarbonil)-2-imidazol-1-ilpropiónico (9, $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$).



Esquema 1. R^1 y R^2 se refieren a hidrógeno o a cualquier sustituyente alquilo conteniendo o no ^{19}F . R se refiere a cualquier sustituyente alquilo.

La preparación y propiedades RMN de algunas de estas moléculas se han descrito en detalle previamente (Gil, M.S., Cruz, F., Cerdan, S. y Ballesteros, P. (1992) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2, 1117-1722 ; Gil, M.S., Zaderenko, P., Cruz, F., Cerdan, S. y Ballesteros, P. (1994) *Bioorg. Med. Chem.* 2, 305- 14 ;
5 Zaderenko, P., Gil, M.S., Ballesteros, P. y Cerdan, S. (1994) *J. Org. Chem.* (1994) 59,6268-73). En general, la medida del pH se basa en la determinación del desplazamiento químico del protón H2 de estos compuestos que actúa como "resonancia informadora" en el medio biológico y su comparación con el desplazamiento químico del protón H2 del mismo compuesto en soluciones
10 modelo de pH conocido. La Figura 1 muestra la dependencia del desplazamiento químico del protón H2 del compuesto 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) con el pH. Una extensión de este procedimiento consiste en obtener imágenes MR del protón H2. Estas imágenes se pueden obtener por medio de una excitación selectiva de H2 y posterior codificación en imagen (métodos de desplazamiento
15 químico-CSI) ó mediante la excitación no selectiva de todo el espectro de protón en diversos voxels contiguos que cubren toda la muestra (métodos de imagen espectroscópica-SI). Ambos métodos revelan la distribución espacial de la resonancia H2 de estos compuestos en la muestra y por tanto la distribución del pH.

20 En esta invención, describimos la utilización de estos compuestos para la obtención de imágenes y espectros de 1H RMN que revelan el pH extracelular en diversos sistemas biológicos; incluyendo orgánulos subcelulares y células aisladas ó cultivadas de animales o plantas, órganos perfundidos, animales intactos y seres humanos. Estos dos últimos aspectos en particular requieren
25 una exploración de la toxicidad y farmacocinética de estos compuestos así como una demostración fehaciente de la eficacia de los procedimientos de obtención de imágenes de pH *in vitro* e *in vivo*. Esta patente describe; 1) las propiedades toxicológicas de algunas sondas útiles de pH extracelular 2) las cinéticas de distribución en sangre e incorporación a tejidos del compuesto menos tóxico de
30 esta nueva serie y 3) los procedimientos *in vitro* e *in vivo* de imagen MR de

desplazamiento químico (CSI) e imagen espectroscópica (SI) que permiten obtener imágenes MR del pH extracelular en muestras modelo y en ratones portadores de tumores RIF-1.

5 ESTUDIOS DE TOXICIDAD EN CULTIVOS CELULARES Y RATONES.

La toxicidad de los compuestos 5 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$), 6 ($R^1=R^2=H$) y 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) se determinó en cultivos celulares utilizando el siguiente procedimiento. Se crecieron fibroblastos de ratón NIH 3T3 en el medio esencial de cultivo modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS, Hyclone, Logan, Utah, USA). Una vez alcanzada la confluencia, se añadieron al medio de cultivo los compuestos 5 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$), 6 ($R^1=R^2=H$) y 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) en un intervalo de concentraciones de 0 a 20mM. Después de 72h de incubación, se determinó el número de células supervivientes en el cultivo mediante el método de Gillies y cols. (Gillies, R.J., Didier, N. y Denton, M. (1986) *Anal. Biochem.* 159 :109-113). Los resultados se presentan en la Tabla 1. El compuesto 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) no resultó tóxico, puesto que los números de células viables en presencia de 20 mM 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$), no fueron significativamente diferentes del control (0 mM). Sin embargo, el compuesto 5 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) mostró una fuerte toxicidad, induciendo muerte celular casi completa en concentraciones de 15 mM (DL_{50} 6,8 mM). Finalmente, el compuesto 6 ($R^1=R^2=H$) mostró una toxicidad moderada, con una reducción significativa del número de células viables observable tan solo en la concentración más alta de 20 mM.

Tabla 1. Efecto de concentraciones crecientes de los compuestos 5 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$), 6 ($R^1=R^2=H$) and 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) en la supervivencia celular.

Concentrac ión (mM)	Compuesto 5 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$)	Compuesto 6 ($R^1=R^2=H$)	Compuesto 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$)
0,0	1,54±0,04	1,39±0,31	1,65±0,12
1,0	1,52±0,10	1,50±0,22	1,68±0,04
5,0	1,02±0,08	1,34±0,11	1,38±0,06
10,0	0,37±0,08	1,40±0,14	1,52±0,13
15,0	0,27±0,01	1,29±0,13	1,60±0,13
20,0	0,20±0,05	1,10±0,06	1,54±0,09

Las determinaciones de supervivencia celular se llevaron a cabo midiendo la densidad óptica media (una medida del número de células) (Gillies, R.J., Didier, N. y Denton, M. (1986) *Anal. Biochem.* 159 :109-113), como se indica en la ref. 24. Los resultados son media±SD de determinaciones en cuatro placas distintas por cada concentración.

También se determinó la toxicidad (LD_{50}) de los compuestos 1 ($R^1=R^2=H$), 4 ($R^1=R^2=H$) y 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) en animales enteros. Estos resultados aparecen recogidos en la Tabla 2. Se inyectaron intraperitonealmente 1 ($R^1=R^2=H$), 4 ($R^1=R^2=H$) y 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) en ratones machos Swiss albino (30-40 g peso corporal) en dosis crecientes de hasta 3g/Kg peso corporal. Se utilizaron al menos siete dosis diferentes para cada compuesto administradas a seis ratones por cada dosis, colocando los seis ratones correspondientes a cada dosis en jaulas independientes. La LD_{50} se determinó una semana después de la inyección mediante el método de Miller and Tainter (Vallette, G. (1966) *Manual of Pharmacodynamics*. Masson et Cie, Eds. Paris, VI^o, pg 70). El compuesto 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) que es, por sus propiedades RMN y su comportamiento en suspensiones de eritrocitos, un indicador muy útil del pH

extracelular, no resultó tóxico hasta dosis de 3 g/Kg peso corporal, y se observó un comportamiento similar en el compuesto 4 ($R^1=R^2=H$). El compuesto 1 ($R^1=R^2=H$) resultó tóxico en el rango de concentraciones ensayadas, pero con una DL_{50} relativamente alta. Por tanto el compuesto 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) presenta propiedades toxicológicas muy apropiadas para su utilización como molécula indicadora del pH extracelular en animales y seres humanos.

Tabla 2. Valores de LD_{50} para los compuestos 1 ($R^1=R^2=H$), 4 ($R^1=R^2=H$) y 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$).

Compuesto	LD_{50} (mg/kg peso corporal)
1 ($R^1=R^2=H$)	250
4 ($R^1=R^2=H$)	> 3000
9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$)	> 3000

- 10 Las determinaciones de LD_{50} se llevaron a cabo por el método de Miller y Tainter (Vallette, G. (1966) Manual of Pharmacodynamics. Masson et Cie, Eds. Paris, VI^o, pg 70).

Farmacocinética.

- 15 La Figura 2 (paneles A-F) muestra los cambios de concentración de los compuestos 1 ($R^1=R^2=H$) y 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) en el plasma y en diversos tejidos después de la administración de 1 mmol de estos compuestos a ratas adultas. En el experimento que muestra el panel 2A, se inyectaron 0,5 ml de una solución 2M de 1 ($R^1=R^2=H$; pH:7,0) ó 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$; pH:7,0) en la vena
- 20 yugular derecha de ratas macho Wistar (277-312 g peso corporal) y se extrajeron muestras de sangre (0,2 ml) de la vena yugular izquierda, antes de la inyección y después de 1, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 minutos. Se prepararon las correspondientes muestras de plasma, se liofilizaron, se resuspendieron en 0,5 ml D_2O (99,9%D) y se analizaron por 1H NMR (360,13 MHz, 22°C, pH 7,2).

- 25 El compuesto 1 ($R^1=R^2=H$) desapareció más lentamente ($t_{1/2}= 17$ min) del plasma que el compuesto 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$, $t_{1/2}= 6$ min). Las concentraciones

más altas de **1** ($R^1=R^2=H$, 1,5 mM) y **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$, 6,6 mM) se alcanzaron, 2 min y 1 min después de la inyección, respectivamente. No se observaron síntomas de toxicidad durante el experimento.

Los paneles 2B-2F muestran las cinéticas de incorporación de **1** ($R^1=R^2=H$) y **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) en diferentes tejidos. En estos experimentos, se inyectó 1 mmol de **1** ($R^1=R^2=H$) ó **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) a tiempo 0 en la vena yugular derecha de ratas Wistar (machos adultos, 250-300 g peso corporal). A los tiempos indicados, se sacrificaron los animales, se aislaron los órganos indicados, y se prepararon y analizaron extractos de metabolitos solubles en ácido perclórico (6%) y por 1H NMR (360,13 MHz, 22°C, pH 7,2) según hemos descrito previamente (Gil, M.S., Cruz, F., Cerdán, S. y Ballesteros, P. (1992) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2, 1117-1722). Las concentraciones de los compuestos en cada tejido se determinaron comparando las intensidades de los protones imidazólicos del compuesto con la intensidad de la resonancia del TSP utilizado como referencia interna (1 mM), corrigiendo en todos los casos para la cantidad de tejido extraído.

El compuesto **1** ($R^1=R^2=H$) se encontró en todos los tejidos analizados, alcanzando concentraciones relativamente altas ($\mu\text{mol/g}$ peso corporal) en el cerebro (15,1), corazón (12,8), músculo esquelético (5,3), riñón (12,1) e hígado (2,2). Las concentraciones alcanzadas en los tejidos fueron superiores a las alcanzadas en plasma (panel 2A) indicando que **1** tiende a acumularse en los espacios intracelulares. Después de abandonar el plasma, las concentraciones más altas de **1** ($R^1=R^2=H$) se encontraron primero en hígado (10 min), después en músculo esquelético y corazón (10-20 min) y finalmente en cerebro y riñón (30 min). En contraste, **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$), no se pudo detectar en el cerebro, se detectaron trazas en hígado ($<0,2$) y corazón ($<0,5$) y alcanzó concentraciones comparables a **1** ($R^1=R^2=H$) en músculo esquelético (5,8) y riñón (13,9). Las trazas de **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) encontradas en corazón e hígado reflejan muy probablemente la contaminación con sangre en estos órganos. Las concentraciones máximas de **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) en tejidos se alcanzaron

primero en el riñón (a los 10 min) y después en el músculo esquelético (a los 20 min). Tan sólo en el riñón **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) alcanza una concentración similar a la detectada en plasma, indicando que este compuesto es un buen marcador del espacio extracelular especialmente en el cerebro, hígado y corazón. Por ultimo **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) alcanzó su concentración más alta en riñón más rápidamente que **1** ($R^1=R^2=H$), pero en el músculo esquelético ocurrió lo contrario.

Imágenes de pH por Resonancia Magnética; 1H CSI y 1H SI.

La Figura 3 muestra la obtención de una imagen de pH utilizando 1H CSI (imagen de desplazamiento químico) y el compuesto **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$). Esta es, hasta lo que conocemos, la primera imagen de la distribución espacial del pH tomada con técnicas de CSI y una sonda molecular extrínseca. En este experimento, se colocó una solución 0,3M de **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$; pH 7,4) en agua en un tubo de RMN de 5mm que contenía en su interior un capilar de 2mm de diámetro lleno de agua. Se obtuvo una imagen de RMN de un corte coronal perpendicular al eje mayor del tubo, utilizando una sonda comercial de microimagen (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten, Alemania) provista de un inserto para tubos de 5 mm y un dispositivo de gradientes magnéticos ortogonales protegidos activamente contra corrientes de Eddy. Las condiciones de adquisición fueron, 8.4 Teslas de Campo Magnético estático (B_0), 22°C de temperatura, 500 μ de sección perpendicular al eje z, excitación selectiva de la resonancia H2 de **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$; 8,04 ppm) mediante una secuencia de eco de espín y codificación en imagen del eco resultante utilizando un gradiente de lectura constante (eje x) y un gradiente de fase variable (eje y); respectivamente (Browun, T.R., Kincaid, B.M. y Ugurbil, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79 :3523 :3526 ; Maudsley, A.A., Hilal, S.K., Perman, W.H. y Simon, H.E. (1983). *J. Mag. Res.* 66 :283-294) La imagen de desplazamiento químico muestra que la resonancia H2 está presente exclusivamente en la porción más externa del tubo, sin contaminar

apreciablemente el espacio ocupado por el capilar coaxial que contiene exclusivamente agua. Dado que la distribución de la resonancia H2 es uniforme en el espacio periférico al capilar, es posible concluir que el pH de 7.4 revelado por la resonancia H2 de **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) es homogéneo en toda la solución.

- 5 Este resultado demuestra que es posible obtener una imagen de aquellas regiones de una muestra que muestran idéntico pH utilizando métodos de CSI y la resonancia H2 del compuesto **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$). Se pueden obtener resultados similares utilizando las otras sondas indicadas en el esquema 1 ó extender estos resultados a nuevas sondas conteniendo ^{19}F mediante ^{19}F CSI.

- 10 Finalmente, llevamos a cabo experimentos de imagen espectroscópica (SI) de **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) en ratones portadores de tumores. Se inocularon subcutáneamente 0,5 ml de tampón Hank's conteniendo 1×10^6 células de Fibrosarcoma inducido por radiación (RIF1) en los flancos de ratones C3H/Hen de 6-8 semanas de edad. Se dejaron crecer los tumores durante 1-2 semanas
- 15 hasta alcanzar volúmenes de 400-900 mm³, determinados con medidas en tres direcciones ortogonales del tumor. Se prepararon los ratones para el experimento de imagen espectroscópica con una inyección intraperitoneal de **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$; 0,15 ml de una solución 1M pH=7,0). Dos a cinco minutos después de la inyección, se anestesiaron los ratones con cetamina (50 mg/Kg) y
- 20 acepromazina (5mg/Kg), inmovilizándolos en una camilla para animales con una bobina solenoidal de 1H apropiada para su utilización en el imán horizontal de 4,7 Teslas. Se ayudó a mantener la temperatura corporal del ratón anestesiado mediante una bolsa de agua caliente recirculante colocada debajo del ratón.

- 25 La camilla para animales y la bobina de 1H están diseñadas para espectroscopía e imagen de 1H en general y no contienen características específicas para la utilización de los derivados de imidazol como sonda de pH extracelular. Se pueden utilizar otros diseños y sondas equivalentes con igual facilidad para este propósito. La imagen espectroscópica se adquirió utilizando la secuencia BASSALE (Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1994) *Mag. Res. in Med.*
- 30 32, 277-84; Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1993) *Mag. Res. in Med.* 30, 661

-71).

La imagen espectroscópica (SI) mostrada en la Figura 4 se obtuvo de voxels de tamaño $2 \times 2 \times 4 \text{ mm}^3$. Cada espectro (x1,y1) hasta (x12,y12) representa un voxel diferente en el tumor. La parte superior (12 ppm-5,5 ppm) muestra la distribución espacial de una de las resonancias de los protones imidazólicos de 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$; ver voxels x10-y8, x11-y8, x10-y7 y x11-y7). La parte inferior muestra la distribución de la resonancia del agua (a 4,7 ppm) en los mismos voxels.

Se puede calcular un valor para el pH en cada voxel a partir de los espectros de la parte superior y las curvas de titulación de los desplazamientos químicos de 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) frente a pH (20, ver Figura 1) Dado que los desplazamientos químicos de este protón no son iguales en cada voxel y que 9 ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) permanece en el espacio extracelular, la variación entre los diversos voxels del desplazamiento químico de 9 refleja heterogeneidad de pH en las diversas zonas del tumor.

En resumen, los resultados presentados en esta patente demuestran un nuevo procedimiento para obtener imágenes de la distribución del pH extracelular en muestras biológicas, no transparentes, utilizando una nueva serie de indicadores extrínsecos y métodos de Resonancia Magnética. Mostramos que algunos de estos indicadores no son tóxicos y permiten determinaciones de pH mediante métodos de imagen de desplazamiento químico (CSI) o imagen espectroscópica (SI) en volúmenes de hasta $0,2 \mu\text{l}$ con resoluciones de pixel de $20 \mu\text{x}20 \mu$ en un campo magnético de 8,4 Teslas. Los resultados de la aplicación de esta metodología *in vivo* en ratones portadores de tumores han proporcionado las primeras evidencias de heterogeneidad de pH *in situ* en tumores RIF-1 implantados en ratones C3H/Hen.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS.

Figura 1. Curva de titulación del compuesto **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$) en D_2O (99,9%D). Los desplazamientos químicos (δ) del protón H_2 se midieron por 1H MRS (360,13 MHz, 22°C) con respecto a TSP interno a 0 ppm. Las medidas de pH no están corregidas para el efecto del D.

Figura 2. Concentraciones en plasma y tejidos de **1** ($R^1=R^2=H$), puntos blancos) y **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$, puntos negros) después de la inyección intravenosa de 1 mmol de cada compuesto en ratas macho Wistar. A: Plasma, B: Hígado, C: Corazón, D: Músculo esquelético (gastrocnemio izquierdo), E: Cerebro y F: Riñón.

Figura 3. Imagen de pH 7,2 de un objeto modelo. Esta imagen muestra las regiones del espécimen que tienen pH=7,2. El objeto es un tubo de RMN de 5 mm de diámetro con una solución 0,3M de **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$, pH 7,2) que contiene insertado un capilar de 2mm de diámetro con agua destilada. La imagen se obtuvo a 8,4 Teslas utilizando una secuencia convencional de eco de spin con excitación selectiva de la señal del protón H_2 (8,08 ppm) en una sección coronal con 500 μ de espesor (eje z). En el dominio del tiempo se recogieron 256 ecos, conteniendo 256 puntos/eco cada uno en presencia de un gradiente constante de lectura (eje x) y de 256 incrementos del gradiente de fase (eje y), respectivamente. La imagen se obtuvo después de una transformación de Fourier bidimensional de la matriz resultante (256x256) utilizando cálculo de magnitud. En la adquisición se empleó una sonda comercial Bruker equipada con gradientes protegidos activamente y un inserto de 5mm. El tamaño del voxel es (x,y,z) 20 μ x20 μ x500 μ (0.2 μ L de volumen) conteniendo 60 nmols de **9** ($R^1=R^2=H$, $R=Et$). Nótese que el capilar interno que contiene agua (a 4,8 ppm) no muestra sangrado de señal H_2 . El tiempo de adquisición fue aproximadamente 60 minutos.

Figura 4. Imágenes espectroscópicas (SI) de la distribución de 9 (R¹=R²=H, R=Et; A) y agua (B) en un tumor RIF-1 implantado en ratones C3H/Hen. La imagen se obtuvo a 4,7 Tesla (Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1994) *Mag. Res. in Med.* 32, 277-84 y Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1993) *Mag. Res. in Med.* 30, 661 -71).

10

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por Resonancia Magnética con indicadores extrínsecos
5 conteniendo ^1H ó ^{19}F .

2. Procedimientos según la reivindicación 1, caracterizados por su utilización en fisiopatología de microorganismos, orgánulos subcelulares, células aisladas ó en cultivo, órganos perfundidos, animales intactos y seres humanos.

10

3. Procedimientos según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizados por la utilización de la serie de compuestos 1-9 del esquema 1 como indicadores extrínsecos y ^1H MRS, ^1H MRI o cualquier combinación de estos métodos; ó ^{19}F MRS y ^{19}F MRI si se incluye ^{19}F como sustituyente en el indicador extrínseco.

15

4. Procedimientos según las reivindicaciones 1, 2, 3, caracterizados por sus aplicaciones de diagnóstico clínico en distrofias musculares, patologías isquémicas y en la evaluación de la respuesta a diversas terapias; en transformación tumoral benigna o maligna, metástasis y en la evaluación de la
20 respuesta tumoral a terapias; en fisiología y medicina del ejercicio y del deporte; o por extensión en cualquier otra situación fisiológica, patológica o terapéutica que involucre modificaciones en el pH intra y extracelular.

5. Procedimientos según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 adaptados para la
25 medida del pH intracelular y obtención de imágenes del pH intracelular mediante el uso de indicadores del esquema 1 modificados para permanecer atrapados en el espacio intracelular.

30

1/4

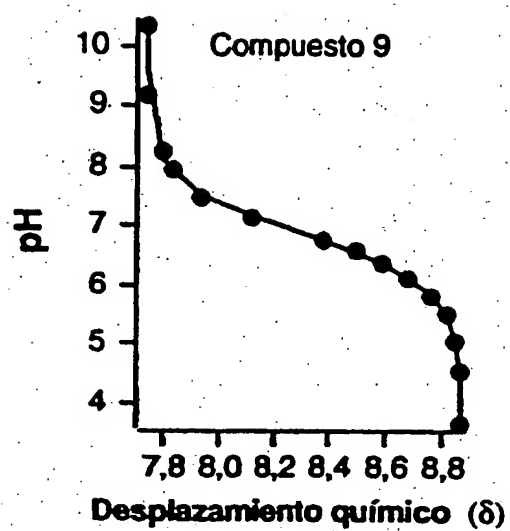


Figura 1

2/4

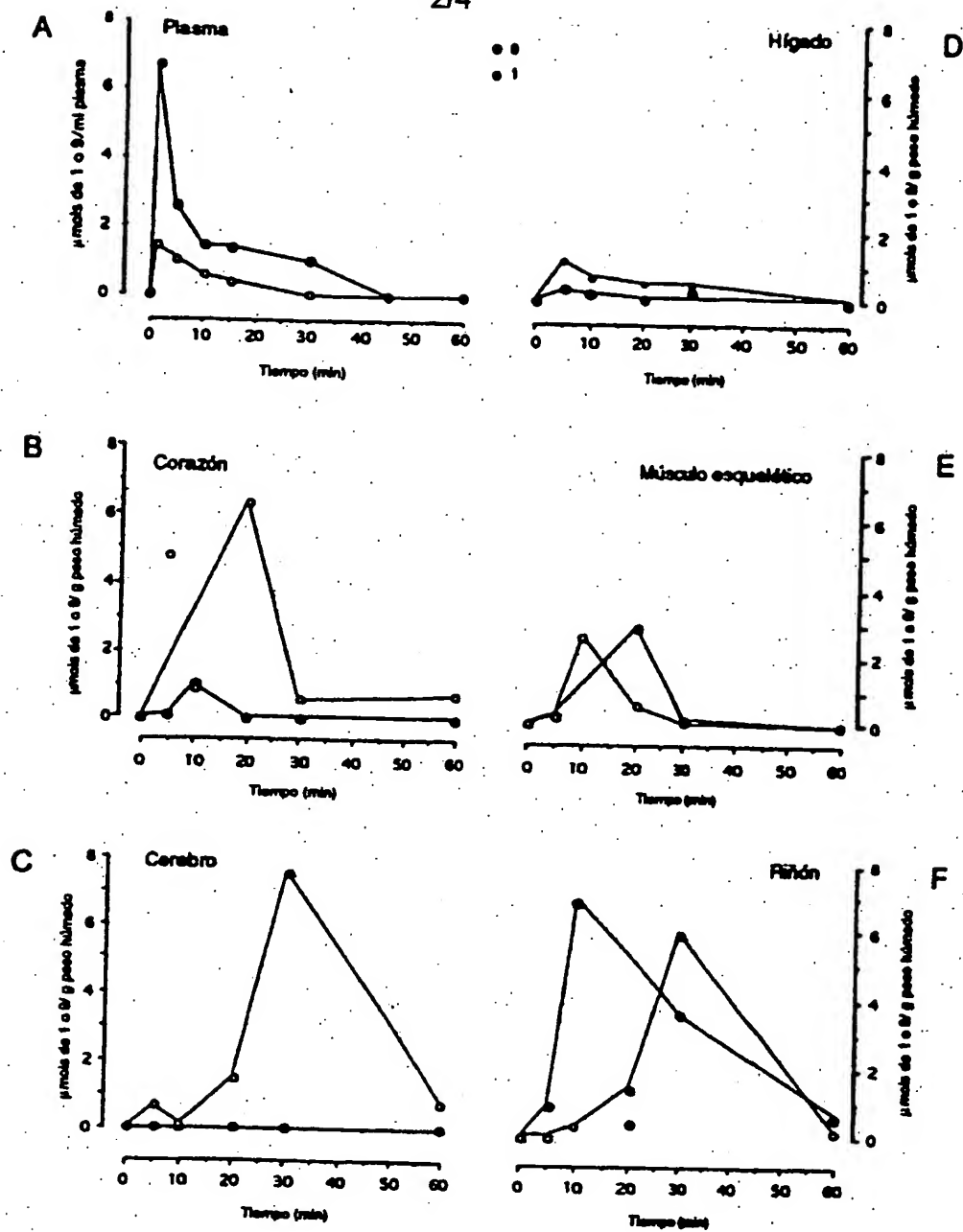


Figura 2

3/4

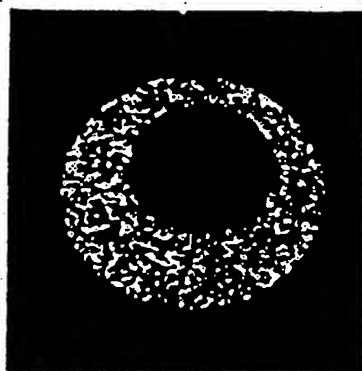


Figura 3

4/4

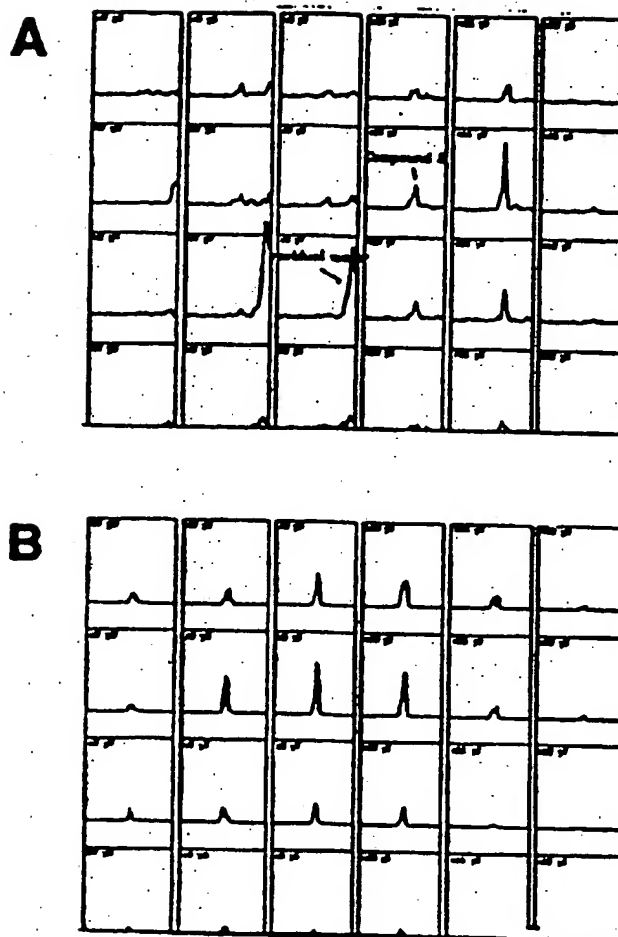


Figura 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 98/00045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6 GO1R33/48, A61B5/055

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6 GO1R33/46, 48; A61B5/055; C07D233.ECLA GO1R33/48G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC; WPIL, PAJ, CIBEPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,A	US - 5639906 - A (London et al) 17 June 1997 (17.06.97) column 3, line 6-column 15, line 40; column 35, line 35-column 44, line 49	1 2,4,5
X A	EP - 0368429 - A (SCHERING A.G.) 16 May 1990 (16.05.90) page 3, line 1 - page 11, line 11; page 46, line 15-48	1
A	WO - 9517910 - A (BRACCO S.P.A.) 6 July 1995 (06.07.95) claims 1,9	1,2
A	EP - 0095124 - A (BRUKER MEDIZINTECHNIK) 30 November 1983 (30.11.83) claim 2; page 12, line 1 -25	1,2
A	WO - 9604249 - A (SRI INTERNATIONAL) 15 February 1996 (15.02.96) see the whole document	1,3,4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 June 1998 (10.06.98)

Date of mailing of the international search report

18 June 1998 (18.06.98)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 98/00045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO -- 9303771 -A (MALLINCKRODT MEDICAL) 4 March 1993 (04.03.93)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 98/00045

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5639906	17/06/97		
EP 0368429	16/05/90	FI 894714 PT 91907 DK 496189 US 5130119 IE 64779 ES 2061959 EP 0579261 EP 0368429 DE 58906941 DE 3834704 CA 2000276 AU 4269389 AU 633850 JP 2270832	08/04/90 30/04/90 08/04/90 14/07/92 06/09/95 16/12/94 19/01/94 16/05/90 24/03/94 07/06/90 07/04/90 21/06/90 11/02/93 05/11/90
WO 9517910	06/07/95	IT 1265440 EP 0735900 JP 9502734	22/11/96 09/10/96 18/03/97
EP 0095124	30/11/83	DE 3219832 AU 1490083 AU 551305 JP 58218950	01/12/83 01/12/83 24/04/86 20/12/83
WO 9604249	15/02/96	US 5721265 EP 0775117 CA 2196900	24/02/98 28/05/97 15/02/96
WO 9303771	04/03/93	US 5248498 EP 0599946 CA 2113996 AU 2406292 AU 657789 JP 6509802	28/09/93 08/06/94 04/03/93 16/03/93 23/03/95 02/11/94

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT / ES 98 / 00045

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ G01R33/48, A61B5/055

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶ G01R33/46, 48; A61B5/055; C07D233. ECLA G01R33/48G

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPIL, PAJ, CIBEPAT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pasajes relevantes	Nº de las reivindicaciones a que se refieren
P, X P, A	US - 5639906 - A (London et al) 17.06.97 *Col 3, lin 6 - Col 15, lin 40; Col 35, lin 35 - Col 44, lin 49*	1 2, 4, 5
X A	EP - 0368429 - A (SCHERING A. G.) 16. 05. 90 *Pg 3, lin 1 - Pg 11, lin 11; Pg 46, lin 15 - 48*	1 2, 4, 5
A	WO - 9517910 - A (BRACCO S. P. A.) 06.07.95 *Reivindicaciones 1, 9*	1, 2
A	EP - 0095124 - A (BRUKER MEDIZINTECHNIK) 30.11.83 *Reivindicación 2; Pg 12, lin 1 - 25 *	1, 2
A	WO - 9604249 - A (SRI INTERNATIONAL) 15.02.96 * Ver el documento completo *	1, 3, 4

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" documentos anterior publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
10 de Junio de 1998

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

18 JUN 1998 (18. 06. 98)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
nº de fax +34 1 3495304

Funcionario autorizado

Antonio Cárdenas Villar
nº de teléfono +34 1 349 53 93

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 98 / 00045

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pájcs relevantes	Nº de las reivindicaciones a que se refieren
A	WO - 9303771 - A (MALLINCKRODT MEDICAL) 04.03.93	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 98 / 00045

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5639906	17/06/97		
EP 0368429	16/05/90	FI 894714 PT 91907 DK 496189 US 5130119 IE 64779 ES 2061959 EP 0579261 EP 0368429 DE 58906941 DE 3834704 CA 2000276 AU 4269389 AU 633850 JP 2270832	08/04/90 30/04/90 08/04/90 14/07/92 06/09/95 16/12/94 19/01/94 16/05/90 24/03/94 07/06/90 07/04/90 21/06/90 11/02/93 05/11/90
WO 9517910	06/07/95	IT 1265440 EP 0735900 JP 9502734	22/11/96 09/10/96 18/03/97
EP 0095124	30/11/83	DE 3219832 AU 1490083 AU 551305 JP 58218950	01/12/83 01/12/83 24/04/86 20/12/83
WO 9604249	15/02/96	US 5721265 EP 0775117 CA 2196900	24/02/98 28/05/97 15/02/96
WO 9303771	04/03/93	US 5248498 EP 0599946 CA 2113996 AU 2406292 AU 657789 JP 6509802	28/09/93 08/06/94 04/03/93 16/03/93 23/03/95 02/11/94